

518, 413

20 Nov 2004 PCT/PTG 17 DEC 2004

(12) NACH DEM VEREINBAR ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
24. Dezember 2003 (24.12.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/107001 A1(51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 33/50

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP03/06435

(22) Internationales Anmeldedatum:
18. Juni 2003 (18.06.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 27 136.4 18. Juni 2002 (18.06.2002) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: LOOS, Ulrich [DE/DE]; Otto-Elsässer Weg 9,
89081 Ulm/Donau (DE).(74) Anwalt: RUFF, WILHELM, BEIER, DAUSTER &
PARTNER; Patentanwälte, Postfach 10 40 36, 70035
Stuttgart (DE).(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,
RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR DIAGNOSING AND TREATING NIS-EXPRESSING CARCINOMAS AND METASTASES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR DIAGNOSE UND BEHANDLUNG VON NIS-EXPRIMIERENDEN KARZINOMEN
UND METASTASEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for diagnosing and/or treating sodium iodide symporter (NIS)-expressing primary carcinomas and metastases, preferably glandular carcinomas, particularly cancers of the thyroid, salivary gland, uterus, and breast, a pharmaceutical composition containing substances which induce or increase expression of the NIS or the function thereof, consequently enhancing absorption of iodide in cells, and corresponding uses. The inventive method can be used for effective tumor-specific radioiodide absorption in the diagnosis and therapy of said carcinomas and metastases.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Diagnose und/oder Behandlung von Natrium-Jodid-Symporter (NIS) exprimierenden primären Karzinomen und Metastasen, vorzugsweise von glandulären Karzinomen, insbesondere von Karzinomen der Schilddrüse, der Speicheldrüse, des Uterus und von Mammakarzinomen, sowie eine pharmakologische Zusammensetzung enthaltend Substanzen, welche die Expression des Symporters NIS bzw. dessen Funktion induzieren bzw. steigern und als Folge die Jodid-Aufnahme in die Zellen verstärken sowie entsprechende Verwendungen. Dies kann für eine effektive tumorspezifische Radiojodid-Aufnahme in der Diagnostik und Therapie von genannten Karzinomen und Metastasen verwendet werden.

WO 03/107001 A1

Verfahren zur Diagnose und Behandlung von NIS-exprimierenden Kar-
5 zinomen und Metastasen

Beschreibung

10 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Diagnose und/oder
Behandlung von Natrium-Jodid-Symporter (NIS) exprimierenden primä-
ren Karzinomen und Metastasen, vorzugsweise von glandulären Karzi-
nomen, insbesondere von Karzinomen der Schilddrüse, der Speichel-
drüse, des Uterus und von Mammakarzinomen, sowie eine pharmakolo-
15 gische Zusammensetzung enthaltend Substanzen, welche die Expressi-
on bzw. die Funktion von NIS induzieren und/oder steigern und als Fol-
ge die Jodid-Aufnahme in die Zellen verstärken, und entsprechende
Verwendungen. Dies wird für eine effektive organspezifische Radiojodid-
Aufnahme in der Diagnostik und Therapie von genannten Karzinomen
20 und Metastasen verwendet.

Aus dem Stand der Technik sind einige Verfahren zur Diagnose und
Behandlung von primären glandulären Karzinomen und Metastasen
glandulärer Karzinome wie der Schilddrüse, der Speicheldrüse, des Ute-
25 rus und von Mammakarzinomen bekannt. Zu bekannten Diagnosever-
fahren gehören die Sonographie, die Mammographie und die Kernspin-
tomographie. Die Nachteile dieser Methoden liegen vor allem darin,
dass sie kombiniert eingesetzt werden müssen, um die Spezifität der
Diagnose zu erhöhen. In der Regel wird eine Stanzbiopsie angeschlos-
30 sen, die zu einer Verschleppung von Krebszellen und somit zur iatrogenen
Metastasierung führen kann. Die endgültige Diagnose muss durch
operative Resektion bzw. Stanzbiopsie und histologische Untersuchung
des Knotens gestellt werden, wobei sich oftmals herausstellt, dass der

Knoten gutartig ist. Durch die aufwendige Diagnostik kommt es häufig zu Zeitverlust und unnötigen operativen Eingriffen.

Die primäre Therapie der genannten Tumore besteht in der Regel in der operativen Resektion des Primärkarzinoms. Je nach Größe des Tumors (z.B. größer als 2 cm im Durchmesser) oder Hinweisen auf Lymphknotenbefall erfolgt insbesondere beim Mammakarzinom zusätzlich die Ausräumung der Lymphknoten der gleichseitigen Achselhöhle, gegebenenfalls auch eine Bestrahlung des überregionalen Gebietes. Postoperativ erfolgen Untersuchungen zum Nachweis oder Ausschluss von Fernmetastasen, d.h. beispielsweise eine Oberbauchsonographie, eine Röntgen-Thorax-Aufnahme und ein Skelett-Szintigramm. Dabei werden nur Metastasen ab einer gewissen Größe erkannt. Kleinere Metastasen, also beispielsweise kleiner als 0,5 cm im Durchmesser, sogenannte Mikrometastasen, werden oftmals nicht erkannt. Beim Knochenszintigramm können degenerative oder entzündliche Veränderungen zu falsch positiven Befunden führen. Im Falle von Metastasen erfolgt eine Chemotherapie, die erhebliche Nebenwirkungen haben kann. Diese Behandlung ist nur palliativ und führt lediglich zu einer geringen Lebenszeitverlängerung.

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, ein Verfahren zur schnellen, spezifischen und zuverlässigen Diagnose sowie zur effektiven Behandlung von Karzinomen und Metastasen, insbesondere von primären glandulären Karzinomen und Metastasen glandulärer Karzinome, insbesondere von Karzinomen der Schilddrüse, der Speicheldrüse, des Uterus und von Mammakarzinomen, eine pharmakologische Zusammensetzung zur Therapie sowie ein *in vitro*-Diagnosesystem an reseziertem Gewebe zur Diagnose und Beurteilbarkeit der Therapiemöglichkeit genannter Karzinome bereit zu stellen.

Zur Lösung dieser Aufgabe schlägt die Erfindung in erster Linie ein Verfahren mit den im Anspruch 1 genannten Merkmalen vor. Weiterbildung-

gen des Verfahrens, pharmakologische Zusammensetzungen sowie entsprechende Verwendungen sind Gegenstand der übrigen abhängigen und unabhängigen Ansprüche 2 bis 39, deren Wortlaut durch Bezugnahme zum Inhalt der Beschreibung gemacht wird.

5

Das oben genannte Ziel wird gemäß der Erfindung durch ein Verfahren erreicht, bei dem durch eine Induktion bzw. Steigerung der NIS-Genexpression und -Funktion in den genannten Tumorarten eine verstärkte Jodid-Aufnahme organspezifisch stimuliert wird, die zu einer spezifischen Diagnose und/oder einer gezielten Therapie genutzt werden kann.

10

Der Natrium-Jodid-Symporter (NIS) ist für die aktive Jodid-Aufnahme in der Schilddrüse verantwortlich. Das Jod wird in den Follikelzellen der Schilddrüse zum Zwecke der Biosynthese der Schilddrüsenhormone gebraucht (N. Carrasco, Biochim Biophys Acta. 1993 Jun 8; 1154 (1): 65-82). Die Expression von NIS ist über Jahrzehnte für die Diagnose und Behandlung der differenzierten Schilddrüsenkarzinome basierend auf der Applikation von Radiojodid genutzt worden (E.L. Mazzaferri, 1996 in The Thyroid, eds. L.E. Braverman and R.D. Utiger (Lippincott-Raven, Philadelphia), pp. 942-945). NIS wird auch in vielen extrathyreoidalen Geweben wie Nieren, Plazenta, Speicheldrüsen, Magenmukosa und laktierende Brustdrüse teils funktional exprimiert, wie auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen wurde (A. De La Vieja et al., Physiol Rev. 2000 Jul. 80 (3): 1083-105).

15

20

25

NIS wurde bei 80% des menschlichen Brustdrüsenkrebses mittels Immunhistochemie nachgewiesen (U.H. Tazebay et al., Nat Med. 2000 Aug. 6 (8):871-8), ohne dass jedoch eine biologische *in vivo*-Funktion erkannt wurde. Brustkrebs ist der dritthäufigste Krebs in der Welt und die häufigste maligne Erkrankung bei Frauen. Die Expression von funktionalem NIS kann daher bei der Radiojodid-Diagnose und -Therapie von responsiven Tumoren der Brust nützlich sein (siehe Übersichten von A.

30

De La Vieja et al., *Physiol Rev.* 2000 Jul. 80 (3):1083-105; C. Riedel et al., *Trends Biochem Sci.* 2001 Aug. 26 (8):490-6; A.E. Heufelder et al., *Thyroid.* 2001 Sep. 11 (9): 839-47).

- 5 Faktoren, die die NIS-Expression und die Jodid-Aufnahme in Brustkrebszellen modulieren, sind bisher nicht im Detail untersucht worden. Kürzlich ist über die Induktion des NIS-Gens durch *trans*-Retinsäure (tRA) in der Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 berichtet worden. Es wurde ge-
mutmaßt, dass die tRA-induzierte NIS-Expression durch zwei Familien
10 von nukleären Rezeptoren, nämlich Retinsäure-Rezeptoren (RARs) und Retinoid-X-Rezeptoren (RXRs) stimuliert wird (T. Kogai et al., *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000 Jul. 97 (15): 8519-24). MCF-7-Zellen exprimieren neben funktionalen RAR/RXR auch nukleäre PPAR- γ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor- γ) (M.W. Titcomb et al., *Mol Endocrinol.* 1994
15 Jul. 8 (7): 870-7; M.W. Kilgore et al., *Mol Cell Endocrinol.* 1997 May 129 (2): 229-35). PPAR- γ reguliert in Gegenwart von entsprechenden Ligan-
den durch Heterodimerisierung mit RAR/RXR (RXR α , RXR β oder RXR γ) die Transkription von Zielgenen (M. Sato et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Jan. 280 (3): 646-51). PPAR- γ und RAR/RXR werden in
20 verschiedenen bösartigen epithelialen Tumoren wie Gehirn-, Brust-, Prostata- und Lungenkarzinomen koexprimiert (J.O. Nwankwo and M.E. Robbins, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2001 Apr.-May 64 (4-5): 241-5; K. Inoue et al., *Anticancer Res.* 2001 Jul.-Aug. 21 (4A): 2471-6).

25

- Die vorliegende Erfindung zeigt, dass eine Jodid-Aufnahme in Zellen bestimmter Karzinome durch eine gleichzeitige oder zeitversetzte Einwirkung von PPAR- γ -Liganden und RAR/RXR-Liganden erheblich gesteigert werden kann, wobei die PPAR- γ -Liganden die durch die
30 RAR/RXR-Liganden induzierte Jodid-Aufnahme um ein vielfaches potenzieren. Dieser Synergismus ist auf eine Heterodimerisierung der Rezeptoren PPAR- γ und RAR/RXR und eine dadurch induzierte bzw. sti-

mulierte und/oder verstärkte Expression des NIS-Gens zurückzuführen. Eine hierdurch bewirkte Steigerung der Jodid-Aufnahme in die Zelle wird erfindungsgemäß dazu genutzt, NIS-exprimierende primäre Karzinome und Metastasen, insbesondere Primärtumore und/oder Metastasen glandulärer Karzinome, insbesondere von Karzinomen der Schilddrüse, der Speicheldrüse, des Uterus und von Mammakarzinomen sowie anderen glandulären Karzinomen, zu diagnostizieren und zu therapieren.

Zum Nachweis der Expressionsinduktion des NIS-Gens in den ausgewählten Karzinomen durch die heterodimerisierenden Rezeptoren PPAR- γ und RAR/RXR wurde in der vorliegenden Erfindung insbesondere die Wirkung von beispielsweise Ciglitazon (CIG), einem synthetischen Liganden des PPAR- γ , auf die Jodid-Aufnahme durch MCF-7-Zellen mit und ohne Zugabe von *trans*-RA (tRA) untersucht. Die Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 exprimiert die Rezeptoren PPAR- γ und RAR/RXR (M.W. Kilgore et al., Mol Cell Endocrinol. 1997 May 129 (2): 229-35). Erfindungsgemäß konnte gezeigt werden, dass die durch die entsprechenden Liganden aktivierten Rezeptoren die Expression des NIS-Gens synergistisch induzieren bzw. stimulieren und/oder verstärken und damit die Funktion von NIS verstärken.

Ciglitazon (CIG) gehört zur Substanzklasse der synthetischen Thiazolidindione (TZDs), welche die potentesten Induktoren von PPAR- γ darstellen (G.J. Murphy and J.C. Holder, Trends Pharmacol Sci. 2000 Dec. 21 (12): 469-74). Diese Substanz wurde als selektiver Aktivator von PPAR- γ beschrieben (Y. Sugiyama et al., Nippon Rinsho. 2000 Feb. 58 (2): 370-5).

Die vorliegende Erfindung zeigt, dass CIG in Kombination mit tRA die Jodid-Aufnahme in der Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 im Vergleich mit der durch tRA allein induzierten bzw. gesteigerten Jodid-Aufnahme deutlich verstärkt, während CIG alleine keine Wirkung zeigt (Fig. 1). Die durch

CIG und tRA induzierte NIS-Expression bzw. die dadurch bewirkte Jodid-Aufnahme ist spezifisch für MCF-7-Zellen. Beispielsweise in der Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa konnte nach einer Behandlung über 48 Stunden mit CIG und tRA keine Jodid-Aufnahme beobachtet werden (**Fig. 2**).

5

Die Behandlung von MCF-7-Zellen mit tRA allein steigert die Jodid-Aufnahme um ca. das 6-fache. Die Kombination von tRA mit CIG steigert jedoch die Jodid-Aufnahme um ca. das 20-fache im Vergleich zu unbehandelten Zellen (**Fig. 1**). Eine gleichzeitige Behandlung der Brustkrebszellen mit CIG und tRA bewirkt somit einen mehr als 3-fachen Anstieg in der Jodid-Aufnahme im Vergleich zu nur mit tRA behandelten Zellen. CIG alleine induziert die Jodid-Aufnahme in MCF-7-Zellen nicht. Weiterhin wurde erfindungsgemäß gezeigt, dass durch eine Behandlung der Zellen mit tRA die Konzentration von NIS-mRNA deutlich ansteigt, was eine Wirkung der Substanzen auf der Transkriptionsebene belegt. Diese Ergebnisse zeigen, dass die NIS-Genexpression synergistisch durch die Behandlung von CIG in Kombination mit Retinsäure in der Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 gesteigert wird.

10

15

20 Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass *trans*-Retinsäure (tRA) die Jodid-Aufnahme in MCF-7-Zellen induziert, indem es die NIS-Expression stimuliert, wobei die Wirkung von tRA durch die Rezeptoren RAR/RXR vermittelt wird (T. Kogai et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2000 Jul. 97 (15): 8519-24). Die Ergebnisse, die zur vorliegenden Erfindung geführt haben, zeigen das Vorliegen von funktionalen responsiven Elementen für die Rezeptoren PPAR- γ und RAR/RXR in Krebszellen, wobei die responsiven Elemente bzw. die Rezeptoren synergistisch miteinander wechselwirken. Die Beobachtung, dass die durch eine gleichzeitige Einwirkung von CIG und tRA induzierte Zunahme der NIS-Expression
30 spezifisch für MCF-7-Zellen ist und nicht in beispielsweise HeLa-Zellen stattfindet (**Fig. 2**), zeigt die Selektivität des beschriebenen Mechanismus für bestimmte Krebszellen. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der bereits beschriebenen Beobachtung, dass tRA die Jodid-Aufnahme

in anderen Krebs-Zelllinien, wie der Prostatakrebs-Zelllinie LNCaP, der Choriokarzinom-Zelllinie JEG-3 oder zwei nicht kleinzelligen Lungenkrebs-Zelllinien A549 und H460 nicht induziert (T. Kogai et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2000 Jul. 97 (15): 8519-24).

5

Auf der Basis der beschriebenen Ergebnisse wird erfindungsgemäß ein Verfahren zur Diagnose und/oder Behandlung von Natrium-Jodid-Symporter (NIS) exprimierenden Karzinomen und/oder Metastasen vorgeschlagen. Bei diesem Verfahren wird eine Induktion bzw. Steigerung der NIS-Genexpression in den genannten Tumorarten und eine verstärkte Jodid-Aufnahme organspezifisch stimuliert, die zu einer spezifischen Diagnose und/oder einer gezielten Therapie erfindungsgemäß genutzt wird.

10

15 Besonders bevorzugt kann das erfindungsgemäße Verfahren für die Diagnose und/oder Behandlung von glandulären Karzinomen, insbesondere Karzinomen der Speicheldrüse, der Schilddrüse, des Uterus und von Brustkrebs bzw. Mammakarzinomen, und/oder den entsprechenden Metastasen eingesetzt werden.

20

Die induzierte bzw. gesteigerte NIS-Genexpression wird erfindungsgemäß dazu genutzt, durch die verstärkte Expression bzw. Funktion des Natrium-Jodid-Symporters bevorzugt radioaktive Substanzen in die Tumorzellen einzuschleusen. Die Radioaktivität ist als ein sehr sensibler Indikator bei der Diagnostik mittels szintigraphischer Verfahren und/oder als aktives therapeutisches Mittel bei der Therapie mittels Radiolyse nutzbar. Unter Radiolyse ist die Zerstörung der Zellen durch radioaktive Strahlung zu verstehen. Ein besonderer Vorteil der Radiolyse ist, dass auch bei einer nur geringen Aufnahme von Radiojod die radiolytische Wirkung aufgrund der Reichweite der Strahlung auf benachbarte Zellen als sogenannter By-Stander-Effekt übertragen wird.

25

30

Erfindungsgemäß werden Substanzen bevorzugt eingesetzt, die eine hohe Affinität zum Symporter NIS aufweisen, insbesondere Jod und/oder Technetium. Aber auch andere affine Substanzen, insbesondere aus der Gruppe der Halogene, können Verwendung finden. Die

- 5 Anwendung von Radiojodid und/oder Technetium, insbesondere radioaktivem Technetium, nach vorzugsweise systemischem Einsatz der NIS-Gen-induzierenden Wirkstoffe, also insbesondere der PPAR- γ - und RAR/RXR-Liganden, erweist sich erfindungsgemäß als ein besonders wertvolles Mittel zur Diagnose und Behandlung der oben angegebenen
- 10 Tumoren. Besonders vorteilhaft können hierfür als radioaktives Jod ^{123}I , ^{125}I und/oder ^{131}I , insbesondere in Form eines Alkali- oder Erdalkalijodids, beispielsweise Natriumjodid (NaI), verwendet werden. Hierbei wird ^{125}I mit besonderem Vorteil für eine Diagnostik und ^{131}I mit besonderem Vorteil für eine Therapie eingesetzt.

15

- Im Folgenden wird unter dem Begriff „Jodid-Aufnahme“ auch die Aufnahme anderer Substanzen verstanden, die eine Affinität zum Symporter NIS aufweisen und von ihm aktiv transportiert werden können. Die Zugabe der Substanz, deren Transport durch den Natrium-Jodid-
- 20 Symporter nachgewiesen werden soll oder die eine Radiolyse verursachen soll, erfolgt vorteilhafterweise nach einer angemessenen Zeit nach Verabreichung der Wirkstoffe, die der Stimulierung und/oder Verstärkung der NIS-Genexpression dienen. Eine angemessene Zeit kann hierbei beispielsweise etwa 1 bis 5 Tage betragen, vorzugsweise etwa 1 bis
- 25 3 Tage. Besonders bevorzugt sind etwa 2 Tage.

- In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Induktion der NIS-Genexpression mittels einer Behandlung mit mindestens einem PPAR-Liganden, insbesondere einem
- 30 PPAR- γ -Liganden, und mindestens einem RAR/RXR-Liganden als Wirkstoffe, wobei die durch den RAR/RXR-Liganden gesteigerte Jodid-Aufnahme durch den PPAR- γ -Liganden in synergistischer Weise poten-

ziert wird. Besonders bevorzugt werden dabei die Liganden für die beiden Rezeptorarten zeitlich versetzt verabreicht, wobei vorzugsweise der mindestens eine RAR/RXR-Ligand zuerst und der mindestens eine PPAR-Ligand nach einer angemessenen Zeit appliziert wird. In dieser

5 Zeit soll eine anfängliche Induktion der NIS-Gen-Expression erfolgen. Weiterhin kann durch die zeitversetzte Applikation eine Blockierung des PPAR- γ , die durch einen Suppressor bewirkt sein kann, durch einen mit einem entsprechenden Liganden aktivierten RAR/RXR aufgehoben werden, so dass der PPAR- γ -Ligand anschließend maximal wirken kann.

10 Eine geeignete Vorbehandlung mit einem RAR/RXR-Liganden, insbesondere mit Retinsäure, kann vorteilhafterweise über wenige Stunden bis einige Tage durchgeführt werden. Besonders bevorzugt sind 1 bis 3 Tage, insbesondere 2 Tage. Eine derartige Vorbehandlung kann beispielsweise durch eine entsprechende Infusion und/oder durch ein- oder

15 mehrfache orale Verabreichung des entsprechenden Wirkstoffes erfolgen. Weiterhin kann es auch bevorzugt sein, zunächst den mindestens einen PPAR- γ -Liganden zu verabreichen, und den mindestens einen RAR/RXR-Liganden zeitversetzt zu applizieren. Eine gleichzeitige Verabreichung von Liganden für beide Rezeptorarten kann gleichfalls zum

20 gewünschten Ergebnis führen und bevorzugt sein.

Als Liganden für den Rezeptor PPAR- γ werden bevorzugt Wirkstoffe aus der Klasse Thiazolidindione, insbesondere Ciglitazon, Pioglitazon, Rosiglitazon oder Mischungen davon, verwendet. Als Ligand für die Rezeptoren RAR/RXR wird bevorzugt Retinsäure und/oder mindestens ein

25 pharmakologisch verträgliches Derivat davon, insbesondere *trans*-Retinsäure und/oder mindestens ein Derivat davon, eingesetzt. Dieses Derivat kann beispielsweise ein Salz oder ein Ester sein, insbesondere ein Ester mit einer Alkansäure mit vorzugsweise 1 bis 4 C-Atomen.

30

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung können neben den oben beschriebenen Liganden für PPAR- γ und RAR/RXR auch zusätzli-

che Stoffe, die auf die Aktivität der Wirkstoffe modulierend, insbesondere aktivierend wirken, eingesetzt werden. Vorzugsweise handelt es sich bei diesen Stoffen um Aktivatoren, insbesondere Co-Aktivatoren, die beispielsweise einen Komplex mit den beiden Rezeptortypen bilden können. Hierfür kommen Stoffe in Frage, die als weiterer Rezeptor an der Komplexbildung teilnehmen können und aktivierend auf die NIS-Genexpression im erfindungsgemäßen Sinne wirken.

Weiterhin kann durch Verabreichung geeigneter Stoffe die Wirkung von zelleigenen Stoffen, welche insbesondere als Suppressoren hemmend auf die Aktivierung der NIS-Genexpression durch PPAR-Liganden und RAR/RXR-Liganden wirken, abgeschwächt und/oder elimiert werden, so dass die NIS-Genexpression erfindungsgemäß gesteigert werden kann. Beispiele für solche, die Aktivierung der NIS-Genexpression hemmende Suppressoren sind der Leberlipidrezeptor (LXR) und/oder der Schilddrüsenhormonrezeptor (Ide T. et al., Molecular Endocrinolgy, Mai 2003; Behr M. and U. Loos, Exp Clin Endocrinol Diabetes 1996 (104) Suppl 4: 111-6). Diese Rezeptoren und/oder entsprechende Agonisten, z.B. Liganden dieser Rezeptoren, schwächen bzw. supprimieren die Heterodimerisierung von PPAR- γ und RAR/RXR. Durch Verabreichung von Antagonisten dieser supprimierend wirkenden Rezeptoren werden erfindungsgemäß diese Suppressoren ausgeschaltet bzw. blockiert und so die Interaktion von PPAR- γ und RAR/RXR verstärkt und damit deren erfindungsgemäße Wirkung auf die NIS-Genexpression bzw. -Funktion gesteigert. Als Antagonisten können beispielsweise solche Liganden für den Leberlipidrezeptor und/oder Schilddrüsenhormonrezeptor eingesetzt werden, die deren Aktivität blockieren. Beispiele für solche Antagonisten, insbesondere für Schilddrüsenhormonrezeptor-Antagonisten, sind TRIAC und/oder TETRAC.

Weiterhin kann als Aktivator beispielsweise auch ein Histondeacetylase-Inhibitor, insbesondere Trichostatin A und/oder ein Butyrat eingesetzt werden. Für Histondeacetylase-Inhibitoren ist bekannt, dass sie die NIS-

Expression in einer mäßig differenzierten Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie steigert (M. Kitazono et al., J Clin Endocrinol Metab. 2001 Jul. 86 (7): 3430-5). Alternativ können Suppressoren, welche insbesondere die Expression des NIS-Gens herunterregulieren, durch geeignete Substanzen
5 ausgeschaltet bzw. blockiert werden.

Eine gezielte Induktion der NIS-Genexpression zur Diagnose und/oder Therapie der genannten Tumorarten kann erfindungsgemäß auch mit anderen Wirkstoffen erreicht werden. Diese Wirkstoffe können Hormone
10 oder andere Liganden für bestimmte Rezeptoren sein, die auf der Oberfläche der Zellen der angegebenen Metastasen bzw. Karzinomen expri-
miert werden. Als Beispiel für solche Wirkstoffe ist Prolaktin zu nennen, von dem bekannt ist, dass es in laktierenden Brustdrüsenzellen die Jo-
did-Aufnahme modulieren kann.

15

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Diagnoseverfahrens umfasst eine *in vivo*-Diagnose. Hierfür wird mindes-
tens ein Ligand für den Rezeptor PPAR- γ , z.B. ein Thiazolidindion wie
beispielsweise Ciglitazon, und mindestens ein Ligand für den Rezeptor
20 RAR- und/oder RXR, z.B. *trans*-Retinsäure, dem zu untersuchenden Pa-
tienten verabreicht. Die Verabreichung erfolgt bevorzugt oral oder paren-
teral. Eine intravenöse Applikation der Substanzen ist ebenfalls möglich.
Vorzugsweise nach einer angemessenen Zeit, innerhalb derer die Induk-
tion des NIS-Gens erfolgt, wird eine geeignete Dosis einer weiteren Sub-
25 stanz, insbesondere Technetium und/oder radioaktives Jod, z.B.
 131 Jodid, verabreicht. Diese Zeit beträgt vorteilhafterweise etwa 1 bis et-
wa 5 Tage, vorzugsweise etwa 1 bis etwa 3 Tage. Besonders bevorzugt
sind etwa 2 Tage. Vorzugsweise nach einer weiteren angemessenen
Zeitdauer, die zur Jodid-Aufnahme oder beispielsweise Technetium-
30 Aufnahme in Zellen geeignet ist, wird die Aufnahme der Substanz in die
Zellen analysiert. Dies geschieht beispielsweise durch ein Ganzkörper-
szintigramm oder ein lokales Szintigramm, beispielsweise der Brust,
zum Nachweis von Primärtumoren und/oder Metastasen. Da die Jodid-

Aufnahme nach einer solchen Behandlung erfindungsgemäß nur in NIS-exprimierenden Zellen potenziert wird, ermöglicht das erfindungsgemäße *in vivo*-Diagnoseverfahren eine spezifische Indikation von Tumoren. Mit diesem Verfahren können selbst sehr kleine Tumore oder Mikrometastasen mit einem Durchmesser von weniger als 0,5 cm spezifisch erfasst werden, die beispielsweise noch kurativ behandelt werden können. Dies zeigt einen weiteren besonderen Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens, denn der Nachweis derartiger Mikrometastasen ist mit herkömmlichen Diagnoseverfahren in der Regel nicht möglich.

10

Eine Analyse der oben genannten Krebsarten kann erfindungsgemäß auch nach einem *in vitro*-Diagnoseverfahren stattfinden. Dieses kann besonders bevorzugt für eine Ermittlung und/oder Optimierung der Dosis der zu applizierenden Wirkstoffe und/oder Substanzen, insbesondere der entsprechenden Rezeptorliganden, für die nachfolgende Therapie verwendet werden. Das *in vitro*-Diagnoseverfahren kann beispielsweise folgende Schritte umfassen. Die Zellen einer zu untersuchenden Probe, beispielsweise einer operativ resezierten Probe, werden zunächst mit beispielsweise mindestens einem Liganden für den Rezeptor PPAR- γ , z.B. einem Thiazolidindion, und mindestens einem Liganden für den Rezeptor RAR und/oder RXR, z.B. *trans*-Retinsäure, inkubiert. Anschließend werden so vorbereitete Zellen mit beispielsweise radioaktivem Jod und/oder Technetium behandelt. Die Bedingungen hierfür sollen eine Aufnahme des Jods oder Technetiums durch die Zellen erlauben und sind dem Fachmann bekannt. Schließlich kann der Gehalt bzw. die Konzentration des transportierten Jods bzw. Technetiums in den Zellen bestimmt werden. Die Messung des radioaktiven Jods bzw. Technetiums kann mittels bekannter Verfahren, wie beispielsweise in einem Gamma-Counter, durchgeführt werden. Alternativ kann statt Inkubieren mit einer Quelle für radioaktives Jod bzw. Technetium und anschließender Messung der Radioaktivität auch die Expression der NIS-mRNA in den Zellen der zu untersuchenden Probe nach der Behandlung mit den Wirkstoffen bzw. Liganden für die Rezeptoren PPAR- γ und RAR/RXR ge-

15

20

25

30

messen werden. Dabei kann die Bestimmung der Expression von NIS-mRNA mittels Reverser Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) oder anderer aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren erfolgen.

5

Ein erfindungsgemäßes Therapieverfahren zur Behandlung von angegebenen Krebsarten kann beispielsweise folgende Schritte umfassen. Dem zu behandelnden Patienten werden zunächst Wirkstoffe verabreicht, die eine NIS-Genexpression in den genannten Tumorarten induzieren können. Besonders bevorzugt werden hierfür mindestens ein Li-
10 gand für den Rezeptor PPAR- γ , z.B. ein Thiazolidindion, in Kombination mit einem oder mehreren Liganden für den Rezeptor RAR und/oder RXR, z.B. *trans*-Retinsäure, verabreicht, insbesondere oral und/oder parenteral. Eine intravenöse Applikation der Wirkstoffe ist ebenfalls mög-
15 lich. Die Verabreichung der Liganden kann zeitgleich oder zeitversetzt erfolgen. Nach einer angemessenen Zeit, innerhalb derer eine Induktion des NIS-Gens erfolgt, wird eine geeignete Dosis einer Substanz, die eine Radiolyse der Tumorzellen bewirken soll, verabreicht. Hierbei ist insbesondere radioaktives Jodid, z.B. $^{131}\text{Jodid}$, bevorzugt. Weder bei der
20 Therapie noch bei den beschriebenen Diagnoseverfahren ist es zwingend erforderlich, dass bis zur Gabe von beispielsweise radioaktivem Jod eine angemessene Zeit abgewartet wird. Es ist ebenfalls möglich, dass die Verabreichung der Liganden und die Verabreichung von Jod beispielsweise zeitgleich erfolgen. Die beschriebenen Schritte werden
25 nach Bedarf in geeigneten Zeitabständen z.B. zwischen 7 und 14 Tagen wiederholt. Die Radiojodid-Aufnahme erfolgt erfindungsgemäß organspezifisch vorwiegend in die Zellen der angegebenen Tumorarten, in denen durch die Behandlung eine Potenzierung der NIS-Expression und eine verstärkte Jodid-Aufnahme erfolgt. Im Gegensatz zu einer systemi-
30 schen Radiotherapie, die aus dem Stand der Technik bekannt ist, werden mit dem erfindungsgemäßen Therapieverfahren die Tumorzellen benannter Karzinome und Metastasen gezielt angesprochen. Der Behandlungsfortgang und -erfolg kann beispielsweise mit den oben be-

schriebenen *in vivo*- und/oder *in vitro*-Diagnoseverfahren verfolgt werden. Mit besonderem Vorteil kann die erfindungsgemäße Therapie nach einer operativen Entfernung von Primärtumoren erfolgen, um so erfolgreich Metastasen bekämpfen zu können. Unter Umständen kann es
5 auch bevorzugt sein, die erfindungsgemäße Therapie statt einer Operation oder eventuell vor einer Operation einzusetzen. Dies ist insbesondere dann vorteilhaft, wenn eine Operation aus irgendwelchen Gründen nicht in Frage kommt.

- 10 Ferner sind pharmakologische Zusammensetzungen und Präparate enthaltend Wirkstoffe, die eine NIS-Genexpression in den genannten Tumorarten induzieren, stimulieren und/oder verstärken können, Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Bevorzugt enthalten solche Zusammensetzungen als Wirkstoffe Liganden für die Rezeptoren PPAR, insbesondere PPAR- γ , und RAR und/oder RXR. Vorteilhaft sind dabei Zu-
15 sammensetzungen, die mindestens einen Wirkstoff aus der Klasse Thiazolidindione und Retinsäure und/oder ihre Derivate, insbesondere die *trans*-Retinsäure, enthalten. Zusätzlich können solche Zusammensetzungen erfindungsgemäß weitere Stoffe, vorzugsweise Aktivatoren, insbesondere Co-Aktivatoren, des NIS-Gens und/oder Histondeacetylase-
20 Inhibitoren, welche ebenfalls stimulierend auf die NIS-Expression wirken, umfassen. Diesbezüglich wird auf die obige Beschreibung verwiesen. Die Zusammensetzungen oder Präparate können ferner mindestens einen pharmakologisch unbedenklichen Träger- und/oder Hilfsstoff
25 umfassen. Solche Zusammensetzungen bzw. Präparate können erfindungsgemäß als Diagnostika und/oder als Medikamente zur Diagnose und/oder Behandlung von primären Karzinomen und/oder Metastasen, insbesondere von glandulären Karzinomen, vorzugsweise von Karzinomen der Schilddrüse, der Speicheldrüse, des Uterus und/oder von
30 Mammakarzinomen sowie den entsprechenden Metastasen eingesetzt werden.

Die Erfindung umfasst weiterhin einen Kit, insbesondere für die Diagnose und/oder Therapie von NIS-Gen exprimierenden Karzinomen und/oder Metastasen, welcher Wirkstoffe enthält, die eine NIS-Genexpression in den Tumoren induzieren, stimulieren und/oder verstärken können. Besonders bevorzugt enthält dieser Kit mindestens einen Liganden für den Rezeptor PPAR- γ , insbesondere ein Thiazolidindion wie beispielsweise Ciglitazon, und mindestens einen Liganden für den Rezeptor RAR- und/oder RXR, insbesondere eine *trans*-Retinsäure. Zusätzlich kann der Kit eine Quelle für radioaktives Jod und/oder Technetium enthalten. Weiterhin kann der Kit modulierend wirkende Stoffe, vorzugsweise Aktivatoren, insbesondere Co-Aktivatoren, enthalten. Diesbezüglich wird auf die obige Beschreibung verwiesen. Besonders bevorzugt ist hierbei ein Histondeacetylase-Inhibitor, insbesondere Trichostatin A oder ein Butyrat als Aktivator. Bezüglich weiterer Merkmale der erfindungsgemäßen Zusammensetzung und Präparate wird ebenfalls ausdrücklich auf die obige Beschreibung verwiesen.

Schließlich umfasst die Erfindung eine Verwendung von mindestens einem PPAR-Liganden, insbesondere einem PPAR- γ -Liganden, und mindestens einem RAR- und/oder RXR-Liganden zur Herstellung eines Diagnostikmittels zum Nachweis oder zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Karzinomen und/oder Metastasen, die ein NIS-Gen exprimieren. Bei diesen Karzinomen und/oder Metastasen handelt es sich insbesondere um Primärtumore und/oder Metastasen von glandulären Karzinomen, insbesondere von Speicheldrüsenkarzinomen, Schilddrüsenkarzinomen, Uteruskarzinomen und/oder Mamma-
karzinomen.

In einer bevorzugten Ausführungsform dieses Aspektes der Erfindung handelt es sich bei dem mindestens einen PPAR- γ -Liganden um ein oder mehrere Thiazolidindione, insbesondere um Ciglitazon, Pioglitazon und/oder Rosiglitazon. Bei dem mindestens einen RAR- und/oder RXR-

Liganden handelt es sich vorteilhafterweise um Retinsäure, insbesondere *trans*-Retinsäure, und/oder ein oder mehrere pharmakologisch verträgliche Derivate davon. Ein entsprechendes pharmakologisch verträgliches Derivat ist vorteilhafterweise ein Salz und/oder ein Ester der Retinsäure, insbesondere ein Ester mit einer Alkansäure mit vorzugsweise 1 bis 4 C-Atomen.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung ist der Einsatz des Diagnostikmittels und/oder des Medikaments für eine Kombination mit einer Substanz vorgesehen, die durch den Symporter NIS aktiv transportiert wird. Durch die Verwendung der beschriebenen Liganden wird die Expression des NIS-Gens induziert bzw. stimuliert und/oder verstärkt, so dass in den betroffenen Zellen letztendlich eine erhöhte Aktivität dieses Symporters und damit eine verstärkte Aufnahme von Jod oder von anderen Substanzen zu beobachten ist, für welche der Symporter eine Affinität aufweist. Diese verstärkte Aktivität des Symporters wird erfindungsgemäß für eine Diagnose oder eine Therapie ausgenutzt, indem die Aufnahme der affinen Substanz in die Zelle nachgewiesen wird, oder indem durch die Aufnahme von beispielsweise radioaktiven affinen Substanzen eine Radiolyse und damit eine Zerstörung der betroffenen Zellen bewirkt wird. Als affine Substanzen werden insbesondere Halogenide, und hierbei besonders bevorzugt Jod beansprucht. Als weitere affine Substanz ist beispielsweise Technetium bevorzugt.

25

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform dieses Aspektes der erfindungsgemäßen Verwendung ist die radioaktive Substanz radioaktives Jod, vorzugsweise ^{123}I , ^{125}I und/oder ^{131}I . Besonders bevorzugt ist es, wenn das Jod, insbesondere das radioaktive Jod, in Form eines Jodids, vorzugsweise in Form eines Alkali- und/oder Erdalkalijodids vorliegt. Besonders vorteilhaft ist hierbei Natriumjodid (NaI).

30

In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendungen ist das Diagnostikum bzw. das Medikament derart ausgestaltet, dass der mindestens eine RAR/RXR-Ligand zuerst und der mindestens eine PPAR-Ligand nach einer angemessenen Zeit appliziert wird. Eine derartige zeitversetzte Applikation hat den Vorteil, dass die synergistische Wirkung beider Liganden bzw. beider Ligandengruppen verstärkt werden kann, was insbesondere daran liegen kann, dass der Rezeptor PPAR- γ zunächst beispielsweise durch die Gegenwart von Suppressoren in seiner Aktivität unterdrückt wird. Durch die Aktivierung von RAR/RXR durch den oder die entsprechenden Liganden wird auch PPAR- γ in eine aktive Form gebracht, so dass durch die nachfolgende Applikation von Liganden für PPAR- γ der volle synergistische Effekt erreicht werden kann. Andererseits kann es auch vorteilhaft sein, zunächst mindestens einen PPAR-Liganden, insbesondere mindestens einen PPAR- γ -Liganden, und später mindestens einen RAR/RXR-Liganden zu verabreichen. Auch die zeitgleiche Applikation der Ligandengruppen kann bevorzugt sein. Bezüglich weiterer Merkmale dieser erfindungsgemäßen Verwendungen wird ausdrücklich auf die obige Beschreibung verwiesen.

20

Neben der beschriebenen Verwendung der erwähnten Liganden zur Herstellung eines Diagnostikmittels bzw. zur Herstellung eines Medikaments umfasst die Erfindung ebenfalls die Verwendung von mindestens einem PPAR-Liganden, insbesondere einem PPAR- γ -Liganden, und mindestens einem RAR- und/oder RXR-Liganden zum diagnostischen Nachweis bzw. zur Behandlung von Karzinomen und/oder Metastasen, die ein NIS-Gen exprimieren. Bezüglich weiterer Merkmale dieses Aspektes der Erfindung wird auf die obige Beschreibung verwiesen.

25

Das beschriebene erfindungsgemäße Verfahren zur Diagnose und Therapie der oben angegebenen Tumorarten sowie die dazugehörigen Zusammensetzungen, Präparate und Verwendungen weisen gegenüber

30

den bekannten Verfahren und Zusammensetzungen u.a. den Vorteil auf, dass sie eine spezifische Erkennung von Primärtumoren und/oder deren Metastasen sowie eine effektive und tumorspezifische Radiojodtherapie ermöglichen.

5

Weitere Vorteile, Merkmale und Anwendungsmöglichkeiten der Erfindung werden nachstehend anhand der Ausführungsbeispiele mit Bezug auf die Zeichnungen beschrieben. Hierbei können die verschiedenen Merkmale jeweils für sich oder in Kombination miteinander verwirklicht

10 sein. In den Zeichnungen zeigen:

Fig. 1 die Wirkung von CIG auf die tRA-induzierte Jodid-Aufnahme in Brustkrebszellen. Die Zellen wurden mit 1 μ M tRA mit oder ohne 5 μ M CIG über 48 h behandelt und der Jodid-Aufnahmetest mit (schwarze Rechtecke) oder ohne (weiße Rechtecke) 30 mM KClO_4 durchgeführt. Die Werte wurden als Mittelwerte \pm SD (n=3) ausgedrückt;

15

Fig. 2 die zellspezifische Wirkung von tRA und CIG auf die Jodid-Aufnahme. MCF-7- und HeLa-Zellen wurden mit 1 μ M tRA mit oder ohne 5 μ M CIG über 24 h behandelt. Der Jodid-Aufnahmetest wurde in Gegenwart oder Abwesenheit von 30 mM KClO_4 über 1 h durchgeführt. Die Werte wurden als Mittelwerte \pm SD (n=3) ausgedrückt.

20

25

Beispiele

Alle hier benutzten Zelllinien wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ; Braunschweig, Deutschland, DSMZ-Nr.: MCF-7 (ACC 115)) bezogen. MCF-7 Zellen wurden in RPMI

30 1640-Medium mit 10% FCS (fetal calf serum) und Zusatz von 1x nicht-essentieller Aminosäuren, 0,01 mg/ml bovinem Insulin und 5% Penicillin/Streptomycin kultiviert. Die HeLa-Zellen wurden in RPMI 1640 Medi-

um gezüchtet. Alle Reagenzien für die Zellkultur wurden, wenn nicht anders angegeben, von Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland bezogen.

Die Experimente wurden mit dem gepaarten T-Test unter Benutzung
5 des Programms von Statview, Version 5.0 (SAS Institute Inc. USA) statistisch ausgewertet.

Jodid-Aufnahme-Experimente

10

Zellen wurden in Platten mit 24 Vertiefungen (24 Well Plates) 24 h lang gezüchtet. Danach wurden die Zellen gewaschen und anschließend die zu testenden Substanzen (Ciglitazon, *trans*-Retinsäure mit oder ohne KClO₄) in frischem Medium zugegeben. Für die Jodid-Aufnahme wurden
15 die Zellen zuerst zweimal mit vorgewärmten RPMI 1640 Medium ohne FCS gewaschen und dann in 1 ml RPMI 1640 ohne FCS, das 0,1 µCi/ml Na¹²⁵I (spezifische Aktivität: 10 mCi/mmol, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) sowie 10 µM NaI/Vertiefung enthielt, über 1 h lang inkubiert.

20

Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem RPMI 1640 gewaschen und in 2% SDS-PAGE-Probenpuffer (0,0625 M Tris-HCl, pH 6,8) mit 1 U/µl Benzonase (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland) lysiert. Die ¹²⁵I-Aufnahme wurde in einem Gamma-Counter ge-
25 messen. Ein Aliquot von jeder Probe wurde für die Bestimmung der Protein-Konzentration mit dem DC-Protein-Bestimmungskit von Bio-Rad (München, Deutschland) eingesetzt, um damit eine Normierung bei unterschiedlichen Zellzahlen zu erreichen.

30 MCF-7-Zellen wurden zuerst mit 1 µM *trans*-Retinsäure (tRA) (Sigma, München, Deutschland) in Gegenwart oder Abwesenheit von 5 µM CIG (Biomol, Hamburg, Deutschland) über 48 h zu unterschiedlichen Zeitin-

tervallen behandelt. Die maximale Aufnahme wurde bei 1 μ M tRA nach 48 h erreicht. Der Jodid-Aufnahmetest zeigte, dass die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit tRA und CIG die durch tRA um das 5-fache gesteigerte Jodid-Aufnahme nochmals um das 3,3-fache ansteigen (potenzieren) lässt (**Fig. 1**).

Eine Induktion der Jodid-Aufnahme durch kombinierte Stimulation mit CIG und tRA wurde auch in HeLa-Zellen getestet, um die spezifische Wirkung dieser Substanzen auf MCF-7-Zellen aufzuzeigen. HeLa-Zellen wurden mit 1 μ M tRA mit oder ohne 5 μ M CIG über 48 h behandelt. Im Vergleich zu MCF-7-Zellen wurde keine Induktion der Jodid-Aufnahme in HeLa-Zellen nach 48 h Behandlung mit tRA, CIG sowie tRA kombiniert mit CIG beobachtet (**Fig. 2**). Die gleichen Ergebnisse wurden erhalten, wenn HEK-293-Zellen in einem analogen Experiment eingesetzt wurden (Ergebnisse nicht gezeigt). Diese Ergebnisse zeigen die spezifische Wirkung von CIG in Kombination mit tRA in MCF-7-Zellen bezüglich der Jodid-Aufnahme.

Lebensfähigkeit der Zellen wurde durch die Behandlung durch CIG und tRA nicht beeinträchtigt, wie die Färbung mit Trypanblau zeigte (Ergebnisse nicht gezeigt).

Blockierungsexperimente

Um die Spezifität der NIS-vermittelten Jodid-Aufnahme zu testen, wurden die im vorherigen Ausführungsbeispiel beschriebenen Experimente auch in Gegenwart von 30 mM KClO_4 , dem stärksten spezifischen Inhibitor von NIS, durchgeführt.

Die Jodid-Aufnahme wurde durch KClO_4 inhibiert (**Fig. 1**), was auf eine spezifische NIS-vermittelten Jodid-Aufnahme durch die Brustkrebszellen hindeutet.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die tRA-induzierte Jodid-Aufnahme durch CIG um ein vielfaches verstärkt wird und dass dieses durch die spezifische Funktion von NIS vermittelt ist.

- 5 Die vorliegende Erfindung ist nicht auf die oben beschriebenen Anwendungsbeispiele beschränkt. Vielmehr sind viele Abwandlungen möglich, die durch Fachleute erzielbar sind, und damit vom Umfang dieser Erfindung erfasst sind.

10

Literaturstellen

Carrasco N. Iodide transport in the thyroid gland. Biochim Biophys Acta. 1993 Jun 8;1154(1):65-82.

15

De La Vieja A, Dohan O, Levy O, Carrasco N. Molecular analysis of the sodium/iodide symporter: impact on thyroid and extrathyroid pathophysiology. Physiol Rev. 2000 Jul;80(3):1083-105.

- 20 Heufelder AE, Morgenthaler N, Schipper ML, Joba W. Sodium iodide symporter-based strategies for diagnosis and treatment of thyroidal and nonthyroidal malignancies. Thyroid. 2001 Sep;11(9):839-47.

- Inoue K, Kawahito Y, Tsubouchi Y, Yamada R, Kohno M, Hosokawa Y,
25 Katoh D, Bishop-Bailey D, Hla T, Sano H. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-gamma in human lung cancer. Anticancer Res. 2001 Jul-Aug;21(4A):2471-6.

- Kilgore MW, Tate PL, Rai S, Sengoku E, Price TM. MCF-7 and T47D
30 human breast cancer cells contain a functional peroxisomal response. Mol Cell Endocrinol. 1997 May 16;129(2):229-35.

- Kitazono M, Robey R, Zhan Z, Sarlis NJ, Skarulis MC, Aikou T, Bates S, Fojo T. Low concentrations of the histone deacetylase inhibitor, depsipeptide (FR901228), increase expression of the Na(+)/I(-) symporter and iodine accumulation in poorly differentiated thyroid carcinoma cells. J Clin Endocrinol Metab. 2001 Jul;86(7):3430-5.
- Kogai T, Schultz JJ, Johnson LS, Huang M, Brent GA. Retinoic acid induces sodium/iodide symporter gene expression and radioiodide uptake in the MCF-7 breast cancer cell line. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Jul 18;97(15):8519-24.
- Mazzaferri EL, 1996 in The Thyroid, eds. Braverman LE and Utiger RD (Lippincott-Raven, Philadelphia), pp. 942-945.
- Murphy GJ, Holder JC. PPAR-gamma agonists: therapeutic role in diabetes, inflammation and cancer. Trends Pharmacol Sci. 2000 Dec;21(12):469-74. Review.
- Nwankwo JO, Robbins ME. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression in human malignant and normal brain, breast and prostate-derived cells. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2001 Apr-May;64(4-5):241-5.
- Riedel C, Dohan O, De la Vieja A, Ginter CS, Carrasco N. Journey of the iodide transporter NIS: from its molecular identification to its clinical role in cancer. Trends Biochem Sci. 2001 Aug;26 (8):490-6.
- Sato M, Yajima Y, Kawashima S, Tanaka K, Kagechika H. Synergistic potentiation of thiazolidinedione-induced ST 13 preadipocyte differentiation by RAR synergists. Biochem Biophys Res Commun. 2001 Jan 26;280(3):646-51.

Sugiyama Y, Murase K, Ikeda H. Mechanisms of thiazolidinedione derivatives for hypoglycemic and insulin sensitizing effects. Nippon Rinsho. 2000 Feb;58(2):370-5. Review. Japanese.

- 5 Tazebay UH, Wapnir IL, Levy O, Dohan O, Zuckier LS, Zhao QH, Deng HF, Amenta PS, Fineberg S, Pestell RG, Carrasco N. The mammary gland iodide transporter is expressed during lactation and in breast cancer. Nat Med. 2000 Aug;6(8):871-8.
- 10 Titcomb MW, Gottardis MM, Pike JW, Allegretto EA. Sensitive and specific detection of retinoid receptor subtype proteins in cultured cell and tumor extracts. Mol Endocrinol. 1994 Jul;8(7):870-7.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Diagnose und/oder Therapie von NIS-Gen exprimierenden Karzinomen und/oder Metastasen, bei welchen eine Aufnahme von Substanzen, die durch den Symporter NIS in die Zellen von Karzinomen und/oder Metastasen aktiv transportiert werden, mittels einer Induktion der NIS-Genexpression in diesen Zellen stimuliert und/oder verstärkt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die NIS-Gen exprimierenden Karzinome und/oder Metastasen Primärtumore und/oder Metastasen von glandulären Karzinomen, insbesondere Speicheldrüsenkarzinomen, Schilddrüsenkarzinomen, Uteruskarzinomen und/oder Mammakarzinomen, sind.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Induktion der NIS-Genexpression mittels einer Behandlung mit Wirkstoffen, insbesondere mit mindestens einem PPAR- γ -Liganden und mindestens einem RAR- und/oder RXR-Liganden erfolgt.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass der mindestens eine PPAR- γ -Ligand ein Thiazolidindion, insbesondere aus der Gruppe bestehend aus Ciglitazon, Pioglitazon, Rosiglitazon oder Mischungen davon, ist.
5. Verfahren nach Anspruch 3 oder Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass der mindestens eine RAR- und/oder RXR-Ligand Retinsäure, insbesondere *trans*-Retinsäure, und/oder mindestens ein pharmakologisch verträgliches Derivat davon ist.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass das pharmakologisch verträgliche Derivat ein Salz oder ein Ester, insbesondere ein Ester mit einer Alkansäure mit vorzugsweise 1 bis 4 C-Atomen, ist.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass ferner mindestens ein Stoff verabreicht wird, der die Stimulierung und/oder die Verstärkung durch die Wirkstoffe moduliert, insbesondere verstärkt, wobei vorzugsweise der Stoff mindestens einen Suppressor der NIS-Genexpression, insbesondere einen Leberlipidrezeptor und/oder einen Schilddrüsenhormonrezeptor, antagonisiert.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Substanz, die durch den Symporter NIS in die Zellen von Karzinomen und/oder Metastasen aktiv transportiert wird, ein Halogen, insbesondere Jod, ist, wobei vorzugsweise das Jod in Form eines Alkali- und/oder Erdalkalijodids, vorzugsweise als Natriumjodid, vorliegt.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Substanz, die durch den Symporter NIS in die Zellen von Karzinomen und/oder Metastasen aktiv transportiert wird, Technetium ist.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Substanz, die durch den Symporter NIS in die Zellen von Karzinomen und/oder Metastasen aktiv transportiert wird, radioaktiv ist, insbesondere radioaktives Jod, vorzugsweise ^{123}I , ^{125}I und/oder ^{131}I .

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass der mindestens eine RAR/RXR-Ligand zuerst und der mindestens eine PPAR- γ -Ligand nach einer angemessenen Zeit appliziert wird, insbesondere nach etwa einigen Stunden bis etwa einigen Tagen, vorzugsweise nach etwa 1 bis etwa 3 Tagen.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass Metastasen mit einem Durchmesser kleiner als etwa 1 cm, insbesondere kleiner als etwa 0,5 cm, diagnostizierbar und/oder behandelbar sind.
13. Verfahren zur *in vivo*-Diagnose von NIS-Gen exprimierenden Karzinomen und/oder Metastasen von Karzinomen, insbesondere von glandulären Karzinomen, vorzugsweise Speicheldrüsenkarzinomen, Schilddrüsenkarzinomen, Uteruskarzinomen und/oder Mammakarzinomen, welches mindestens die folgenden Schritte umfasst:
 - a) Verabreichen von Wirkstoffen, die eine Induktion der NIS-Genexpression in Zellen von Karzinomen und/oder Metastasen zu stimulieren und/oder zu verstärken vermögen,
 - b) Verabreichen von mindestens einer Substanz, die durch den Symporter NIS in die Zellen aktiv transportiert werden kann, insbesondere von radioaktivem Jod und/oder Technetium,
 - c) Bestimmen der Aufnahme der besagten Substanz durch die Zellen, insbesondere mittels eines lokalen Szintigramms und/oder eines Ganzkörperszintigramms.
14. Verfahren zur *in vitro*-Diagnose von NIS-Gen exprimierenden Karzinomen und/oder Metastasen von Karzinomen, insbesondere von

glandulären Karzinomen, vorzugsweise Speicheldrüsenkarzinomen, Schilddrüsenkarzinomen, Uteruskarzinomen und/oder Mammakarzinomen, welches mindestens die folgenden Schritte umfasst:

- a) Inkubieren von Zellen einer zu untersuchenden Probe mit Wirkstoffen, die eine Induktion der NIS-Genexpression in Zellen von Karzinomen und/oder Metastasen zu stimulieren und/oder zu verstärken vermögen,
- b) Inkubieren der im ersten Schritt erhaltenen Zellen mit mindestens einer Substanz, die durch den Symporter NIS in die Zellen aktiv transportiert werden kann, insbesondere mit radioaktivem Jod und/oder Technetium,
- c) Bestimmen der Aufnahme der besagten Substanz durch die Zellen.

15. Verfahren zur *in vitro*-Diagnose von NIS-Gen exprimierenden Karzinomen und/oder Metastasen von Karzinomen, insbesondere von glandulären Karzinomen, vorzugsweise Speicheldrüsenkarzinomen, Schilddrüsenkarzinomen, Uteruskarzinomen und/oder Mammakarzinomen, welches mindestens die folgenden Schritte umfasst:

- a) Inkubieren von Zellen einer zu untersuchenden Probe mit Wirkstoffen, die eine Induktion der NIS-Genexpression in Zellen von Karzinomen und/oder Metastasen zu stimulieren und/oder zu verstärken vermögen,
- b) Bestimmen der Expression von NIS-mRNA durch die Zellen, insbesondere mittels Reverser Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).

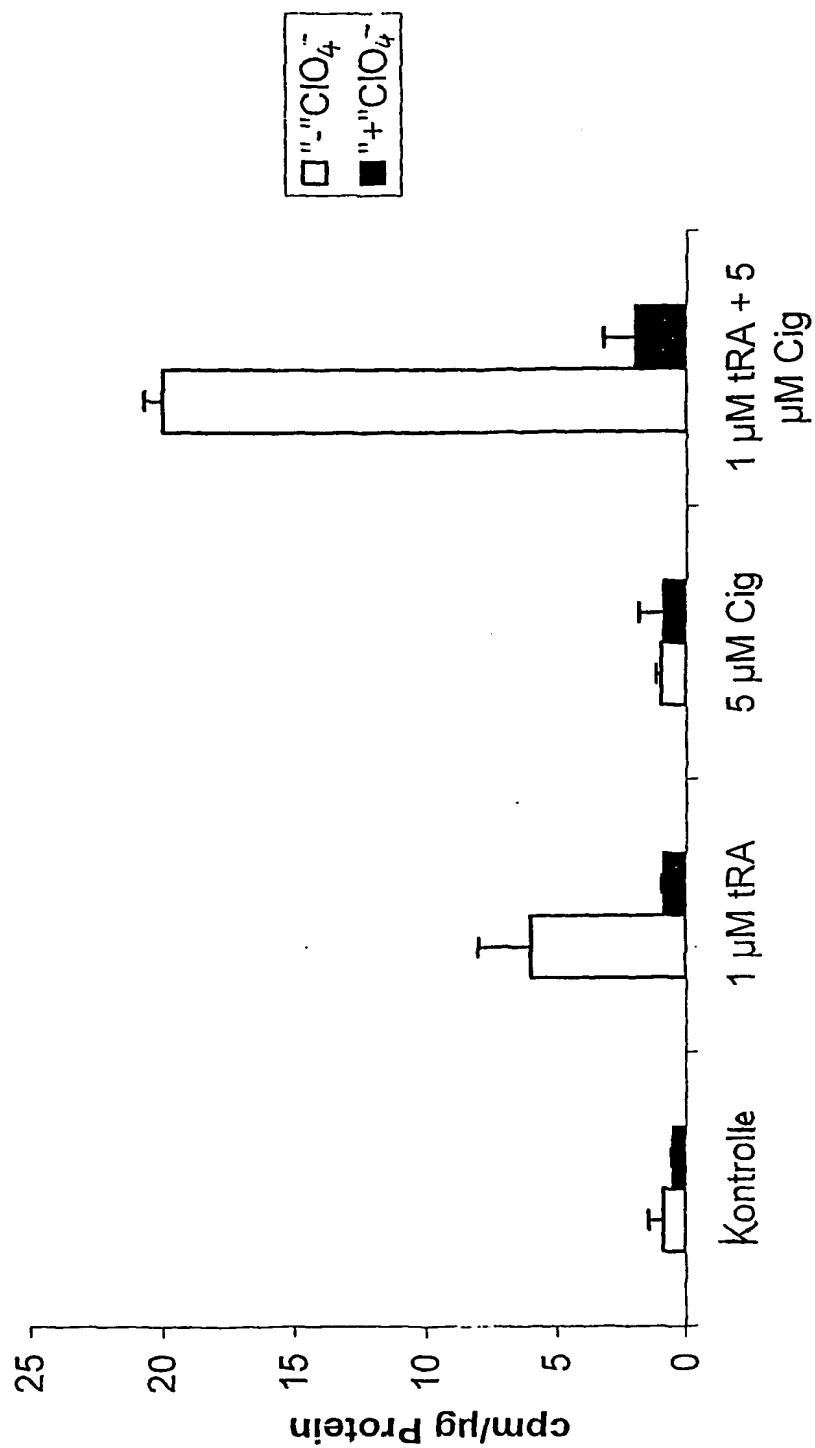
16. Zusammensetzung für eine Diagnose und/oder Therapie von NIS-Gen exprimierenden Karzinomen und/oder Metastasen, dadurch gekennzeichnet, dass diese Zusammensetzung Wirkstoffe enthält, welche eine Induktion der NIS-Genexpression in den Zellen von Karzinomen und/oder Metastasen stimulieren und/oder verstärken.
17. Zusammensetzung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die NIS-Gen exprimierenden Karzinome und/oder Metastasen Primärtumore und/oder Metastasen von glandulären Karzinomen, insbesondere Speicheldrüsenkarzinomen, Schilddrüsenkarzinomen, Uteruskarzinomen und/oder Mammakarzinomen, sind.
18. Zusammensetzung nach Anspruch 16 oder Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Wirkstoffe mindestens ein PPAR- γ -Ligand und mindestens ein RAR- und/oder RXR-Ligand sind.
19. Zusammensetzung nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass der PPAR- γ -Ligand ein Thiazolidindion, insbesondere aus der Gruppe bestehend aus Ciglitazon, Pioglitazon, Rosiglitazon oder Mischungen davon, ist.
20. Zusammensetzung nach Anspruch 18 oder Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass der RAR- und/oder RXR-Ligand Retinsäure, insbesondere *trans*-Retinsäure, und/oder mindestens ein pharmakologisch verträgliches Derivat davon ist.
21. Zusammensetzung nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass das pharmakologisch verträgliche Derivat ein Salz oder ein Ester, insbesondere ein Ester mit einer Alkansäure mit vorzugsweise 1 bis 4 C-Atomen, ist.

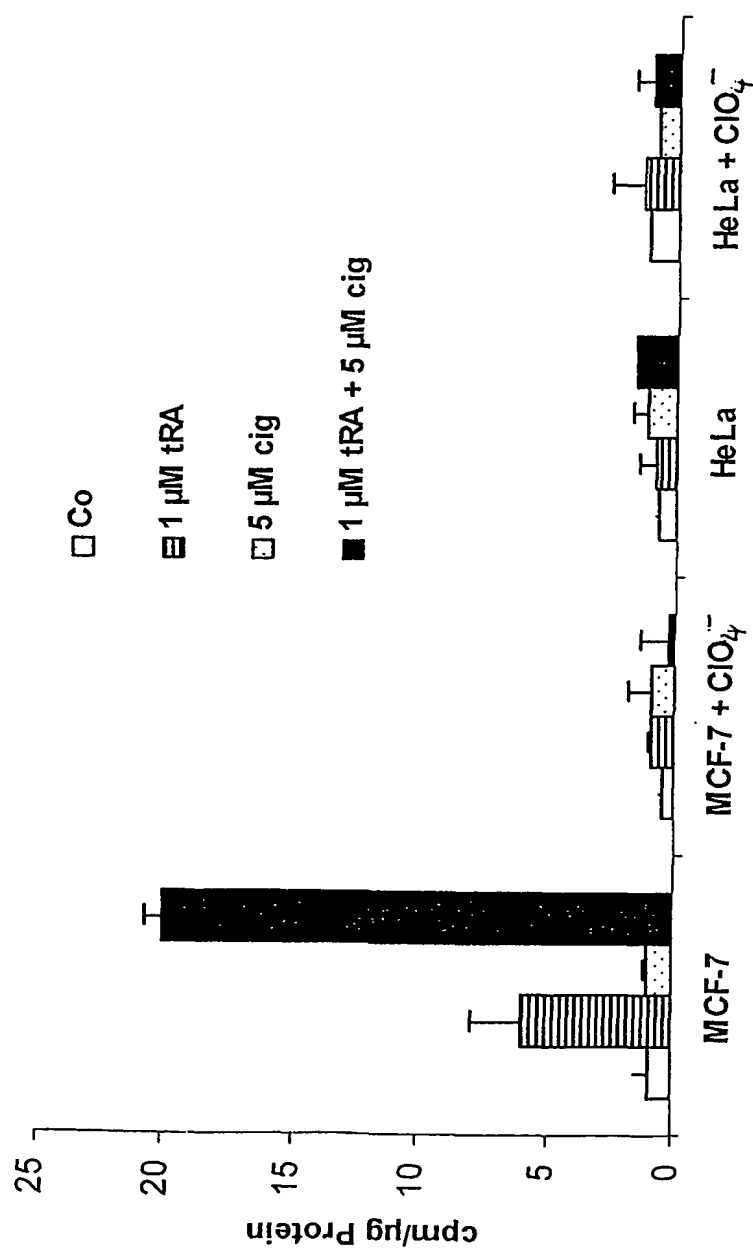
22. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 16 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass sie ferner mindestens einen Stoff enthält, der die Stimulierung und/oder Verstärkung durch die Wirkstoffe moduliert, insbesondere verstärkt, wobei vorzugsweise der Stoff mindestens einen Suppressor der NIS-Genexpression, insbesondere einen Leberlipidrezeptor und/oder einen Schilddrüsenhormonrezeptor, antagonisiert.
23. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 16 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass sie ferner einen Histondeacetylase-Inhibitor, insbesondere Trichostatin A und/oder ein Butyrat, enthält.
24. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 16 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass sie ferner mindestens einen pharmakologisch unbedenklichen Träger- und/oder Hilfsstoff umfaßt.
25. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 16 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass sie zur oralen und/oder parenteralen Verabreichung vorgesehen ist.
26. Kombinationspräparat in Form eines Kits, umfassend räumlich voneinander getrennt die Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 16 bis 25, sowie mindestens eine Substanz, die durch den Symporter NIS in die Zellen von Karzinomen und/oder Metastasen aktiv transportiert werden kann, zur getrennten, gegebenenfalls zeitlich abgestuften Anwendung zur Diagnose und/oder Therapie von NIS-Gen exprimierenden Karzinomen und/oder Metastasen, insbesondere von glandulären Karzinomen, vorzugsweise Speicheldrüsenkarzinomen, Schilddrüsenkarzinomen, Uteruskarzinomen und/oder Mammakarzinomen.

27. Kombinationspräparat nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass die Substanz, die durch den Symporter NIS in die Zellen von Karzinomen und/oder Metastasen aktiv transportiert wird, ein Halogenid, insbesondere Jod, und/oder Technetium ist.
28. Kombinationspräparat nach Anspruch 26 oder Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, dass die Substanz, die durch den NIS-Symporter in die Zellen von Karzinomen und/oder Metastasen aktiv transportiert wird, radioaktiv ist.
29. Kombinationspräparat nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, dass die radioaktive Substanz das radioaktive Jod ^{123}I , ^{125}I und/oder ^{131}I ist, welches insbesondere in Form eines Alkali- oder Erdalkalijodids, vorzugsweise als Natriumjodid, vorliegt.
30. Verwendung von mindestens einem PPAR- γ -Liganden und mindestens einem RAR- und/oder RXR-Liganden zur Herstellung eines Diagnostikmittels zum Nachweis von Karzinomen und/oder Metastasen, die mindestens ein NIS-Gen exprimieren.
31. Verwendung von mindestens einem PPAR- γ -Liganden und mindestens einem RAR- und/oder RXR-Liganden zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Karzinomen und/oder Metastasen, die mindestens ein NIS-Gen exprimieren.
32. Verwendung nach Anspruch 30 oder Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass die Karzinome und/oder Metastasen Primärtumore und/oder Metastasen von glandulären Karzinomen, insbesondere Speicheldrüsenkarzinomen, Schilddrüsenkarzinomen, Uteruskarzinomen und/oder Mammakarzinomen, sind.

33. Verwendung nach einem der Ansprüche 30 bis 32, dadurch gekennzeichnet, dass der mindestens eine PPAR- γ -Ligand ein Thiazolidindion, insbesondere aus der Gruppe bestehend aus Ciglitazon, Pioglitazon, Rosiglitazon oder Mischungen davon, ist.
34. Verwendung nach einem der Ansprüche 30 bis 33, dadurch gekennzeichnet, dass der mindestens eine RAR- und/oder RXR-Ligand Retinsäure, insbesondere *trans*-Retinsäure, und/oder mindestens ein pharmakologisch verträgliches Derivat davon ist.
35. Verwendung nach Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet, dass das pharmakologisch verträgliche Derivat ein Salz oder ein Ester, insbesondere ein Ester mit einer Alkansäure mit vorzugsweise 1 bis 4 C-Atomen, ist.
36. Verwendung nach einem der Ansprüche 30 bis 35, dadurch gekennzeichnet, dass das Diagnosemittel und/oder das Medikament ferner mindestens einen Stoff umfasst, der eine Stimulierung und/oder Verstärkung einer NIS-Genexpression durch die Wirkstoffe moduliert, insbesondere verstärkt, wobei vorzugsweise der Stoff mindestens einen Suppressor der NIS-Genexpression, insbesondere einen Leberlipidrezeptor und/oder einen Schilddrüsenhormonrezeptor, antagonisiert.
37. Verwendung nach einem der Ansprüche 30 bis 36, dadurch gekennzeichnet, dass der Einsatz des Diagnostikmittels und/oder des Medikaments für eine Kombination mit einer Substanz, die durch den Symporter NIS aktiv transportiert wird, insbesondere einem Halogenid, vorzugsweise Jod, und/oder Technetium, vorgesehen ist, wobei vorzugsweise das Jod in Form eines Alkali- und/oder Erdalkalijodids, vorzugsweise als Natriumjodid, vorliegt.

38. Verwendung nach Anspruch 37, dadurch gekennzeichnet, dass die Substanz eine radioaktive Substanz ist, insbesondere radioaktives Jod, vorzugsweise ^{123}I , ^{125}I und/oder ^{131}I .
39. Verwendung nach einem der Ansprüche 30 bis 38, dadurch gekennzeichnet, dass eine Verabreichung des Diagnostikmittels und/oder des Medikaments so vorgesehen ist, dass der mindestens eine RAR- und/oder RXR-Ligand zuerst und der mindestens eine PPAR-Ligand nach einer angemessenen Zeit appliziert wird, insbesondere nach etwa einigen Stunden bis etwa einigen Tagen, vorzugsweise nach etwa 1 bis etwa 3 Tagen.
-

Fig. 1

Fig. 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/06435

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, MEDLINE, EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 198 05 788 A (LOOS) 19 August 1999 (1999-08-19)	1-3, 7-10, 16, 17, 22-29
Y	abstract column 7, line 35 -column 8, line 26 claims 1-5 --- -/-	4-6, 11-15, 18-21, 30-39

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 October 2003

Date of mailing of the international search report

13/11/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Madlener, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/06435

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KOGAI T ET AL: "Retinoic acid induces sodium/iodide symporter gene expression and radioiodide uptake in the MCF-7 breast cancer cell line." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA. UNITED STATES 18 JUL 2000, vol. 97, no. 15, 18 July 2000 (2000-07-18), pages 8519-8524, XP002258675 ISSN: 0027-8424 cited in the application	1-3, 5-10, 12-17, 22-29
Y	abstract page 8523, right-hand column -page 8524, right-hand column ---	4,11, 18-21, 30-39
X	SPITZWEG C ET AL: "Treatment of prostate cancer by radioiodine therapy after tissue-specific expression of the sodium iodide symporter." CANCER RESEARCH. UNITED STATES 15 NOV 2000, vol. 60, no. 22, 15 November 2000 (2000-11-15), pages 6526-6530, XP002258676 ISSN: 0008-5472	1,2, 8-10, 12-17, 22-29
Y	abstract page 6528, right-hand column -page 6529 ---	3-7,11, 18-21, 30-39
X	SPITZWEG C ET AL: "In vivo sodium iodide symporter gene therapy of prostate cancer." GENE THERAPY. ENGLAND OCT 2001, vol. 8, no. 20, October 2001 (2001-10), pages 1524-1531, XP002258677 ISSN: 0969-7128	1,2, 8-10, 12-17, 22-29
Y	abstract page 1526, right-hand column, paragraph 2 -page 1529, left-hand column, paragraph 1 ---	3-7,11, 18-21, 30-39
	--- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Application No

PCT/EP 03/06435

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SCHMUTZLER C: "Regulation of the sodium/iodide symporter by retinoids: A review." EXPERIMENTAL AND CLINICAL ENDOCRINOLOGY & DIABETES, vol. 109, no. 1, 2001, pages 41-44, XP009018335 ISSN: 0947-7349	1-3, 5-10, 12, 16, 17, 22-29
Y	abstract page 42, right-hand column -page 43, right-hand column	4, 11, 13-15, 18-21, 30-39
X	MEHTA RAJENDRA G ET AL: "A ligand of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, retinoids, and prevention of preneoplastic mammary lesions." JOURNAL OF THE NATIONAL CANCER INSTITUTE (BETHESDA)., vol. 92, no. 5, 1 March 2000 (2000-03-01), pages 418-423, XP009018462 ISSN: 0027-8874	1-6, 11, 12, 16-25, 31-36, 39
Y	page 421, middle column -page 422	7-10, 13-15, 26-30, 37, 38
X	ELSTNER E ET AL: "Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 95, July 1998 (1998-07), pages 8806-8811, XP000909123 ISSN: 0027-8424	1-6, 11, 12, 16-25, 31-36, 39
Y	abstract page 8809, right-hand column -page 8810	7-10, 13-15, 26-30, 37, 38
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Application No

PCT/EP 03/06435

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SATO M ET AL: "Synergistic potentiation of thiazolidinedione-induced ST 13 preadipocyte differentiation by RAR synergists." BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS. UNITED STATES 26 JAN 2001, vol. 280, no. 3, 26 January 2001 (2001-01-26), pages 646-651, XP002258678 ISSN: 0006-291X	16-21, 24,25
Y	abstract page 650	1-15,22, 23,26-39
X	SCHULMAN IRA G ET AL: "Transactivation by retinoid X receptor-peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARGamma) heterodimers: Intermolecular synergy requires only the PPARGamma hormone-dependent activation function" MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 18, no. 6, June 1998 (1998-06), pages 3483-3494, XP002258679 ISSN: 0270-7306	16-21, 24,25
Y	abstract page 3492	1-15,22, 23,26-39
X	WESTIN STEFAN ET AL: "Interactions controlling the assembly of nuclear-receptor heterodimers and co-activators" NATURE (LONDON), vol. 395, no. 6698, 10 September 1998 (1998-09-10), pages 199-202, XP002258680 ISSN: 0028-0836	16-21, 24,25
Y	abstract	4,5, 8-15, 26-30, 32-39
A	KOGAI T ET AL: "Differential regulation of the human sodium/iodide symporter gene promoter in papillary thyroid carcinoma cell lines and normal thyroid cells." ENDOCRINOLOGY. UNITED STATES AUG 2001, vol. 142, no. 8, August 2001 (2001-08), pages 3369-3379, XP002258681 ISSN: 0013-7227 the whole document	1-39

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Application No

PCT/EP 03/06435

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FILETTI S ET AL: "Sodium/iodide symporter: a key transport system in thyroid cancer cell metabolism." EUROPEAN JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY / EUROPEAN FEDERATION OF ENDOCRINE SOCIETIES. ENGLAND NOV 1999, vol. 141, no. 5, November 1999 (1999-11), pages 443-457, XP002258682 ISSN: 0804-4643 the whole document	1-39
A	KITAZONO M ET AL: "Low concentrations of the histone deacetylase inhibitor, depsipeptide (FR901228), increase expression of the Na ⁺ /I ⁻ symporter and iodine accumulation in poorly differentiated thyroid carcinoma cells" JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM, NEW YORK, NY, US, vol. 86, no. 7, July 2001 (2001-07), pages 3430-3435, XP002225997 ISSN: 0021-972X the whole document	23
T	TANOSAKI SAKAE ET AL: "Effect of ligands of nuclear hormone receptors on sodium/iodide symporter expression and activity in breast cancer cells." BREAST CANCER RESEARCH AND TREATMENT, vol. 79, no. 3, 20 June 2003 (2003-06-20), pages 335-345, XP009018337 ISSN: 0167-6806 the whole document	1-39
P,X Y	WO 02 055688 A (FOJO ANTONIO TITO ;BATES SUSAN ELAINE (US); GOVERNMENT OF THE UNIT) 18 July 2002 (2002-07-18) abstract page 19, line 22 -page 19, line 27 page 21, line 4 -page 21, line 13 claims 1-34	1,2,16, 17,23-29 3-15, 18-22, 30-39

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP03/06435

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

SEE FURTHER INFORMATION PCT/ISA/210
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box I.1

Although Claims 1-12 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out on the basis of the alleged effects of the compound or composition.

Although Claims 1-13 relate to a diagnostic method practised on the human or animal body, the search was carried out on the basis of the alleged effects of the compound or composition.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/06435

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
DE 19805788	A	19-08-1999	DE	19805788 A1	19-08-1999
WO 02055688	A	18-07-2002	CA	2434269 A1	18-07-2002
			WO	02055688 A2	18-07-2002

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/06435

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 G01N33/50		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 G01N A61K		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) BIOSIS, MEDLINE, EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data, EMBASE		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE 198 05 788 A (LOOS) 19. August 1999 (1999-08-19)	1-3, 7-10, 16, 17, 22-29
Y	Zusammenfassung Spalte 7, Zeile 35 - Spalte 8, Zeile 26 Ansprüche 1-5 ----- -/-	4-6, 11-15, 18-21, 30-39
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen </div> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie </div> </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>*A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>*E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>*L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>*O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>*P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>*T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>*X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>*Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>*Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 21. Oktober 2003		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 13/11/2003
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Madlener, M .

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	KOGAI T ET AL: "Retinoic acid induces sodium/iodide symporter gene expression and radioiodide uptake in the MCF-7 breast cancer cell line." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA. UNITED STATES 18 JUL 2000, Bd. 97, Nr. 15, 18. Juli 2000 (2000-07-18), Seiten 8519-8524, XP002258675 ISSN: 0027-8424 in der Anmeldung erwähnt	1-3, 5-10, 12-17, 22-29
Y	Zusammenfassung Seite 8523, rechte Spalte -Seite 8524, rechte Spalte	4,11, 18-21, 30-39
X	SPITZWEG C ET AL: "Treatment of prostate cancer by radioiodine therapy after tissue-specific expression of the sodium iodide symporter." CANCER RESEARCH. UNITED STATES 15 NOV 2000, Bd. 60, Nr. 22, 15. November 2000 (2000-11-15), Seiten 6526-6530, XP002258676 ISSN: 0008-5472	1,2, 8-10, 12-17, 22-29
Y	Zusammenfassung Seite 6528, rechte Spalte -Seite 6529	3-7,11, 18-21, 30-39
X	SPITZWEG C ET AL: "In vivo sodium iodide symporter gene therapy of prostate cancer." GENE THERAPY. ENGLAND OCT 2001, Bd. 8, Nr. 20, Oktober 2001 (2001-10), Seiten 1524-1531, XP002258677 ISSN: 0969-7128	1,2, 8-10, 12-17, 22-29
Y	Zusammenfassung Seite 1526, rechte Spalte, Absatz 2 -Seite 1529, linke Spalte, Absatz 1	3-7,11, 18-21, 30-39
	--- -/--	

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	SCHMUTZLER C: "Regulation of the sodium/iodide symporter by retinoids: A review." EXPERIMENTAL AND CLINICAL ENDOCRINOLOGY & DIABETES, Bd. 109, Nr. 1, 2001, Seiten 41-44, XP009018335 ISSN: 0947-7349	1-3, 5-10,12, 16,17, 22-29
Y	Zusammenfassung Seite 42, rechte Spalte -Seite 43, rechte Spalte	4,11, 13-15, 18-21, 30-39
X	MEHTA RAJENDRA G ET AL: "A ligand of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, retinoids, and prevention of preneoplastic mammary lesions." JOURNAL OF THE NATIONAL CANCER INSTITUTE (BETHESDA)., Bd. 92, Nr. 5, 1. März 2000 (2000-03-01), Seiten 418-423, XP009018462 ISSN: 0027-8874	1-6,11, 12, 16-25, 31-36,39
Y	Seite 421, mittlere Spalte -Seite 422	7-10, 13-15, 26-30, 37,38
X	ELSTNER E ET AL: "Ligands for peroxisome proliferator-activated receptorgamma and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, Bd. 95, Juli 1998 (1998-07), Seiten 8806-8811, XP000909123 ISSN: 0027-8424	1-6,11, 12, 16-25, 31-36,39
Y	Zusammenfassung Seite 8809, rechte Spalte -Seite 8810 --- -/--	7-10, 13-15, 26-30, 37,38

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	SATO M ET AL: "Synergistic potentiation of thiazolidinedione-induced ST 13 preadipocyte differentiation by RAR synergists." BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS. UNITED STATES 26 JAN 2001, Bd. 280, Nr. 3, 26. Januar 2001 (2001-01-26), Seiten 646-651, XP002258678 ISSN: 0006-291X	16-21, 24,25
Y	Zusammenfassung Seite 650	1-15,22, 23,26-39
X	SCHULMAN IRA G ET AL: "Transactivation by retinoid X receptor-peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARGamma) heterodimers: Intermolecular synergy requires only the PPARGamma hormone-dependent activation function" MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, Bd. 18, Nr. 6, Juni 1998 (1998-06), Seiten 3483-3494, XP002258679 ISSN: 0270-7306	16-21, 24,25
Y	Zusammenfassung Seite 3492	1-15,22, 23,26-39
X	WESTIN STEFAN ET AL: "Interactions controlling the assembly of nuclear-receptor heterodimers and co-activators" NATURE (LONDON), Bd. 395, Nr. 6698, 10. September 1998 (1998-09-10), Seiten 199-202, XP002258680 ISSN: 0028-0836	16-21, 24,25
Y	Zusammenfassung	4,5, 8-15, 26-30, 32-39
A	KOGAI T ET AL: "Differential regulation of the human sodium/iodide symporter gene promoter in papillary thyroid carcinoma cell lines and normal thyroid cells." ENDOCRINOLOGY. UNITED STATES AUG 2001, Bd. 142, Nr. 8, August 2001 (2001-08), Seiten 3369-3379, XP002258681 ISSN: 0013-7227 das ganze Dokument	1-39

-/--

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	FILETTI S ET AL: "Sodium/iodide symporter: a key transport system in thyroid cancer cell metabolism." EUROPEAN JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY / EUROPEAN FEDERATION OF ENDOCRINE SOCIETIES. ENGLAND NOV 1999, Bd. 141, Nr. 5, November 1999 (1999-11), Seiten 443-457, XP002258682 ISSN: 0804-4643 das ganze Dokument	1-39
A	KITAZONO M ET AL: "Low concentrations of the histone deacetylase inhibitor, depsipeptide (FR901228), increase expression of the Na+/I- symporter and iodine accumulation in poorly differentiated thyroid carcinoma cells" JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM, NEW YORK, NY, US, Bd. 86, Nr. 7, Juli 2001 (2001-07), Seiten 3430-3435, XP002225997 ISSN: 0021-972X das ganze Dokument	23
T	TANOSAKI SAKAE ET AL: "Effect of ligands of nuclear hormone receptors on sodium/iodide symporter expression and activity in breast cancer cells." BREAST CANCER RESEARCH AND TREATMENT, Bd. 79, Nr. 3, 20. Juni 2003 (2003-06-20), Seiten 335-345, XP009018337 ISSN: 0167-6806 das ganze Dokument	1-39
P,X	WO 02 055688 A (FOJO ANTONIO TITO ;BATES SUSAN ELAINE (US); GOVERNMENT OF THE UNIT) 18. Juli 2002 (2002-07-18)	1,2,16, 17,23-29
Y	Zusammenfassung Seite 19, Zeile 22 -Seite 19, Zeile 27 Seite 21, Zeile 4 -Seite 21, Zeile 13 Ansprüche 1-34	3-15, 18-22, 30-39

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 03/06435

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN**PCT/ISA/ 210****Fortsetzung von Feld I.1**

Obwohl die Ansprüche 1-12 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

Obwohl die Ansprüche 1-13 sich auf ein Diagnostizierverfahren, das am menschlichen/tierischen Körper vorgenommen wird, beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

INTERNATIONAL RESEARCH REPORT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/06435

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
DE 19805788	A	19-08-1999	DE	19805788 A1	19-08-1999
WO 02055688	A	18-07-2002	CA	2434269 A1	18-07-2002
			WO	02055688 A2	18-07-2002